



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift

⑯ DE 195 14 089 A 1

⑯ Int. Cl. 6:
G 01 N 33/569
C 12 Q 1/70
// C12Q 1/28

DE 195 14 089 A 1

⑯ Aktenzeichen: 195 14 089.3
⑯ Anmeldetag: 13. 4. 95
⑯ Offenlegungstag: 24. 10. 96

⑯ Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑯ Vertreter:

Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑯ Erfinder:

Erfinder wird später genannt werden

⑯ Entgegenhaltungen:

EP 04 63 570 A1
EP 03 86 563 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Nachweisverfahren für HIV-TAT

⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von
HIV-TAT in einer Körperprobe, umfassend die folgenden
Verfahrensschritte:
(a) Entnahme einer Körperprobe und Inkubation dieser mit
einem Detergens und hohem Salz,
(b) Größenfraktionierung der Körperprobe von (a), und
(c) Inkubation der Körperprobe von (b) mit einem Anti-HIV-
TAT-Antikörper.
Ferner betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des
Verfahrens geeigneten Kit.

BEST AVAILABLE COPY

DE 195 14 089 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von HIV-TAT in einer Körperprobe und einen hierfür verwendbaren Kit.

Es ist bekannt, daß bei AIDS T-Zellen vielfach einen programmierten Zelltod erleiden. Dieser Zelltod wird mit T-Zell-Apoptose bezeichnet. Jüngste Arbeiten des Anmelders weisen darauf hin, daß die T-Zell-Apoptose bei AIDS durch ein mit TAT bezeichnetes HIV-Protein verstärkt wird.

Diese Erkenntnis eröffnet nun die Möglichkeit, eine HIV-Infektion bzw. AIDS besser zu verstehen und neue Therapiemaßnahmen anzudenken. Hierfür ist es allerdings notwendig, HIV-TAT in einer Körperprobe nachweisen zu können. Dies ist jedoch bisher nicht möglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem HIV-TAT in einer Körperprobe nachgewiesen werden kann.

Erfnungsgemäß wird dies mit einem Verfahren erreicht, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:

- (a) Entnahme einer Körperprobe und Inkubation dieser mit einem Detergens und hohem Salz,
- (b) Größenfraktionierung der Körperprobe von (a), und
- (c) Inkubation der Körperprobe von (b) mit einem Anti-HIV-TAT-Antikörper.

Der Ausdruck "Körperprobe" umfaßt Körperproben jeglicher Art von Mensch und Tier. Insbesondere sind dies Blut, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, gastrointestinale Sekrete, Organpunktate, Biopsien und Lymphflüssigkeit.

Für die Entnahme einer Körperprobe können übliche Verfahren verwendet werden. Die Körperprobe wird dann mit einem üblichen Detergens, z. B. NP-40 oder Triton X-100, inkubiert. Auch können mehrere Detergentien, gleichzeitig oder nacheinander, verwendet werden. Günstig ist es, insgesamt 1% Detergens einzusetzen. Des Weiteren wird der Körperprobe hohes Salz zugegeben. Dies kann ein übliches Salz, z. B. NaCl, sein. Auch können mehrere Salze, gleichzeitig oder nacheinander, verwendet werden. Günstig ist es, insgesamt 0,1—1 M Salz einzusetzen. Durch die Verwendung des Detergens und hohen Salzes wird HIV-TAT von assoziierten Proteinen und Nukleinsäuren befreit. Ferner werden durch das Detergens HIV-Virionen in der Körperprobe inaktiviert.

Im weiteren wird die Körperprobe einer Größenfraktionierung unterzogen. Hierfür können übliche Verfahren, z. B. Fraktionierung durch Zentrifugations-(Fraktionierungs)-Säulen der Firma Filtron, Northborough, MA, USA verwendet werden. Günstig ist es, die Fraktionierung in einem Bereich von 5—30 kD durchzuführen.

Des Weiteren wird die Körperprobe mit einem Anti-HIV-TAT-Antikörper inkubiert. Der Ausdruck "HIV-TAT" umfaßt jegliches TAT und Fragmente davon, die von Viren stammen, welche eine HIV-Infektion bedingen und/oder AIDS auslösen können. Auch betrifft der Ausdruck jegliches TAT und Fragmente davon, die synthetisch hergestellt worden sind. Der Antikörper kann polyklonal oder monoklonal sein, wobei ein monoklonaler Antikörper bevorzugt ist. Ferner kann der Antikörper synthetisch sein, wobei ihm gegebenenfalls Teile, die für die Erkennung von HIV-TAT nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere

ersetzt sind, die dem Antikörper weitere günstige Eigenschaften verleihen. Vorteilhaft kann es ferner sein, wenn verschiedene Anti-HIV-TAT-Antikörper gleichzeitig oder nacheinander verwendet werden. Besonders günstig ist es, den oder die Anti-HIV-TAT-Antikörper parallel zu vorstehender Inkubation mit einem definierten TAT-Standard zu inkubieren, wodurch ein quantitativer Nachweis von HIV-TAT in der Körperprobe erleichtert wird.

Die Inkubation der Körperprobe mit dem oder den Anti-HIV-TAT-Antikörpern wie auch die Inkubation letzterer mit einem TAT-Standard kann Bestandteil eines üblichen Verfahrens, wie eines Western Blot, eines ELISA, z. B. Sandwich- oder Kompetitions-ELISA, einer Immunfluoreszenz oder einer Immunpräzipitation, sein. Hierzu kann der Antikörper, wenn es angebracht ist, markiert sein oder in Kombination mit einem markierten gegen ihn gerichteten Antikörper eingesetzt werden.

Das erfungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß HIV-TAT in einer Körperprobe nachgewiesen werden kann. Das Verfahren ist spezifisch und schnell durchführbar. Es eignet sich daher bestens zur Diagnose einer HIV-Infektion und/oder zur Verfolgung einer AIDS-Erkrankung. Letzteres beinhaltet auch den großen Vorteil, die Wirkung von Therapiemaßnahmen, insbesondere gegen HIV-TAT, direkt zu verfolgen.

Erfungsgemäß wird auch ein Kit zum Nachweis von HIV-TAT in einer Körperprobe bereitgestellt. Günstigerweise umfaßt ein solcher Kit folgendes:

- (a) Detergens,
- (b) Lösung hohen Salzes,
- (c) Größenfraktionierungs-Säule,
- (d) Anti-HIV-TAT-Antikörper,
- (e) HIV-TAT-Standard und
- (f) Trägermaterial sowie übliche Hilfsstoffe.

Die vorstehenden Ausführungen zum erfungsgemäßen Verfahren sind hier entsprechend zu berücksichtigen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Die Figur zeigt den spezifischen Nachweis von HIV-TAT in Körperproben von HIV-1-infizierten Personen.

Die Erfindung wird durch das nachfolgende Beispiel erläutert.

Beispiel

Nachweis von TAT in Körperproben von HIV-1-infizierten Personen

Von 33 HIV-1-infizierten Personen wurden Serumproben entnommen. Diese wurden zusammen mit Seren von 20 HIV Personen und einem Überstand von HIV-1-infizierten H9 Zellen auf das Vorliegen von TAT getestet. Ferner wurde synthetisches TAT einem Kontrollserum zugegeben, wodurch ein definierter Standard erhalten wurde.

Vorstehende Seren wurden jeweils mit 1% Triton X-100 und 1 M NaCl inkubiert. Danach wurden die Seren einer Größenfraktionierung im Bereich von 5—30 kD unterzogen, wobei Zentrifugations(Fraktionierungs)-Säulen der Firma Filtron, vgl. vorstehend, verwendet wurden. Die Seren wurden einem Dot Blot-Verfahren unterworfen. Hierzu wurden sie auf eine Nitro-

zellulosemembran aufgetropft und durch Hitze fixiert. Zur Blockierung restlicher Proteinbindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran 2 h bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver, gelöst in PBS (0,01% N3), inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde mit PBS/ 5 0,05% Tween 20 30 min bei Raumtemperatur gewaschen. Dann wurde sie 2 h mit einem käuflichen, TAT- spezifischen Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie 6 x jeweils 5 min mit PBS/0,05% Tween 20 10 gewaschen wurde. Die Nitrozellulosemembran wurde mit einem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, der gegen die konstante Region des ersten, TAT-spezifischen Antikörpers gerichtet war. Danach wurde die Nitrozellulosemembran 6 x jeweils 5 min mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen, bevor sie mit einem Anti-Peroxidase-Komplex 15 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Nitrozellulosemembran wurde 6 x jeweils 5 min mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen, bevor das Signal durch eine colo- 20 rimetrische Reaktion entwickelt wurde (vgl. Figur).

Es zeigte sich, daß mit dem erfundungsgemäßen Verfahren HIV-TAT in einer Körperprobe spezifisch nachgewiesen werden kann.

Patentansprüche

25

1. Verfahren zum Nachweis von HIV-TAT in einer Körperprobe, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- (a) Entnahme einer Körperprobe und Inkubation dieser mit einem Detergens und hohem Salz,
- (b) Größenfraktionierung der Körperprobe von (a), und
- (c) Inkubation der Körperprobe von (b) mit 35 einem Anti-HIV-TAT-Antikörper.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperprobe Blut, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, gastrointestinales Sekret, Organpunktat, Biopsie und/oder Lymphflüssigkeit ist. 40

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß im Verfahrensschritt (a) 1% Detergens und 0,1 bis 1 M Salz verwendet werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß im Verfahrensschritt (b) 45 eine Größenfraktionierung von 5-30 kD erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren ferner den Verfahrensschritt (d) umfaßt, in dem der Anti-HIV-TAT-Antikörper von Verfahrensschritt (c) mit 50 einem TAT-Standard inkubiert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß der Verfahrensschritt (c) und der Verfahrensschritt (d) Bestandteil eines Western Blot, eines ELISA, einer Immunfluores- 55 zenz oder einer Immunpräzipitation sind.

7. Kit zum Nachweis von HIV-TAT in einer Körperprobe, umfassend:

- (a) Detergens,
- (b) Lösung hohen Salzes,
- (c) Größenfraktionierungs-Säule,
- (d) Anti-HIV-TAT-Antikörper,
- (e) HIV-TAT-Standard, und
- (f) Trägermaterial sowie übliche Hilfsstoffe.

60

65

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

BEST AVAILABLE COPY

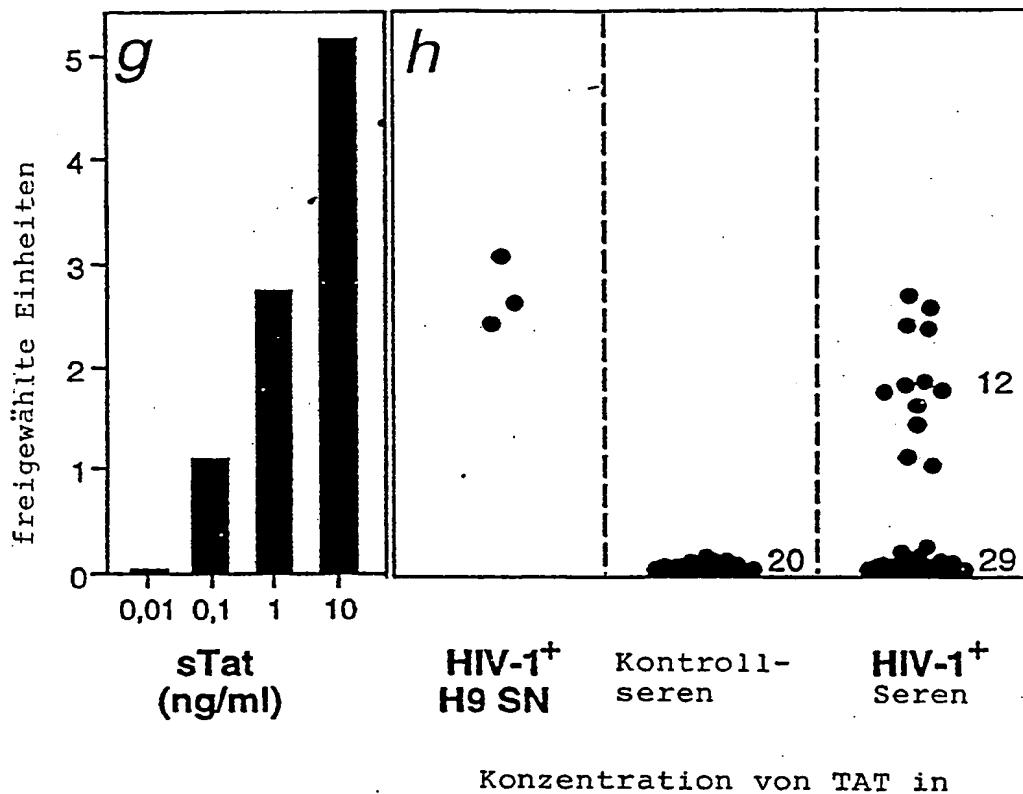


Fig: Spezifischer Nachweis von TAT in Körperproben von HIV-1-infizierten Personen